

# Grupo Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos

Clara G. de los Reyes-Gavilán ([greyes\\_gavilan@ipla.csic.es](mailto:greyes_gavilan@ipla.csic.es)), Abelardo Margolles ([amargolles@ipla.csic.es](mailto:amargolles@ipla.csic.es)), Patricia Ruas-Madiedo ([ruas-madiedo@ipla.csic.es](mailto:ruas-madiedo@ipla.csic.es)), Miguel Gueimonde ([mgueimonde@ipla.csic.es](mailto:mgueimonde@ipla.csic.es))

Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias

A lo largo del siglo XX se ha documentado científicamente la relación existente entre nutrición y salud y en los últimos años han cobrado relevancia los alimentos que promueven el estado de bienestar y/o reducen el riesgo de padecer enfermedades. Surge de este modo el concepto de **Alimentos Funcionales**, campo de investigación de gran interés científico que también supone una oportunidad para el desarrollo de la industria alimentaria. Los alimentos que contienen microorganismos probióticos han sido pioneros en este sector, siendo los productos lácteos el vehículo de administración más ampliamente aceptado por los consumidores. Los **probióticos** se han definido como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2006). Nuestro grupo centra su actividad investigadora actual en el estudio de diferentes aspectos relacionados con los probióticos y su influencia en la salud humana. Ésta constituye una de las Líneas Estratégicas de Investigación actual del IPLA, como se recoge en el Plan Estratégico de Actuación 2010-2013 de la Agencia Estatal CSIC.

Nuestro grupo de investigación se inició como tal hace algunos años con el estudio de microorganismos patógenos (principalmente *Listeria*) y psicrotrofos alterantes presentes en productos lácteos. La actividad científica relacionada con los alimentos funcionales comenzó en el año 1997 con la caracterización de la diversidad y viabilidad de probióticos en leches fermentadas comerciales y actualmente nuestro principal interés científico en este campo se centra en cuatro objetivos:

## ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y FUNCIONALIDAD DE PROBIÓTICOS

Según la definición recogida anteriormente, para que un probiótico pueda ejercer su acción beneficiosa ha de mantener su viabilidad durante la elaboración y la vida útil del alimento funcional y, tras su ingesta, también debe tolerar el estrés gastrointestinal, principalmente el pH ácido del estómago y las sales biliares del intestino. En este campo, nuestro grupo ha sido pionero y ha contribuido activamente en el estudio de repuesta y adaptación a factores de estrés ambientales y tecnológicos en el género *Bifidobacterium*. Una vez en el colón, los probióticos se encuentran en el ecosistema más densamente poblado de la tierra en el que habita la microbiota intestinal y donde la falta de nutrientes es uno de los agentes que ejerce mayor presión selectiva. En este ambiente, los probióticos obtienen su energía de la fermentación de compuestos de la dieta, generalmente carbohidratos, que no son digeridos ni adsorbidos por el hospedador en el intestino delgado y que se denominan **prebióticos**. Un grupo de expertos de la FAO (2007) ha definidos los prebióticos como “componentes alimentarios no viables que confieren un efecto beneficioso en el hospedador asociado a la modulación de la microbiota intestinal”. En esta área estamos estudiado el

potencial prebiótico de nuevos substratos de origen bacteriano, los **exopolisacáridos** (EPS), que son *polímeros extracelulares de gran tamaño presentes en la superficie de muchas bacterias*. Hemos descrito por primera vez cepas de bifidobacterias y lactobacilos del ambiente intestinal capaces de producir EPS y hemos comprobado, empleando diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, que éstos son metabolizados por la microbiota intestinal y que ejercen un efecto bifidogénico. Actualmente, estamos estudiando la dinámica de distintas poblaciones microbianas intestinales en presencia de estos polímeros bacterianos, así como su perfil metabólico mediante el análisis de producción de ácidos grasos de cadena corta. Finalmente, pretendemos evaluar la interacción entre probióticos y patógenos entéricos y asociados con la ingesta de alimentos, con el doble objetivo de conocer los mecanismos de capacidad antimicrobiana de los probióticos así como proponer el uso de probióticos seleccionados capaces de ejercer un efecto antagonístico frente a patógenos frecuentemente asociados a poblaciones humanas de riesgo (neonatos pre-término, ancianos, etc.)

## ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE DISTINTAS POBLACIONES HUMANAS

Estos estudios nos permiten, por un lado, identificar posibles desviaciones (disbiosis) en la diversidad y dinámica de la comunidad microbiana intestinal en grupos específicos de individuos (neonatos prematuros, ancianos, alérgicos, enfermedades autoinmunes) con el objetivo de diseñar estrategias de intervención encaminadas a paliar y/o corregir estas anomalías mediante el uso de probióticos específicos. Por otro lado, la necesidad de utilizar individuos sanos para comparar con las poblaciones anteriormente indicadas, nos ha permitido aislar, identificar y caracterizar cepas con potencial probiótico para ser empleadas en las poblaciones diana específicas. Por ello en nuestro grupo disponemos de una colección de cepas de diversos orígenes (leche materna, microbiota de niños y adultos sanos, cepas adaptadas a sales biliares, etc.) siendo las mejor caracterizadas, hasta el momento, las que pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. En este punto, es necesario señalar que para que una cepa pueda ser considerada probiótica su funcionalidad, es decir su efecto beneficioso, debe de ser demostrada en la población diana en la que se pretende aplicar mediante estudios de intervención con un diseño adecuado. Nuestro grupo también ha estado implicado en la ejecución de estudios clínicos con cepas pertenecientes a la industria.

## INTERACCIÓN PROBIÓTICOS – HOSPEDADOR Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Cuando los probióticos son ingeridos entran en contacto con la mucosa intestinal en la cual, además de las células epite-



**Foto 1.** Grupo Probióticos, Prebióticos y Exopolisacáridos en octubre de 2011: Borja Sánchez, Claudio Hidalgo, David Ríos, Silvia Arbolea, Miguel Gueimonde, Patricia Ruas-Madiedo (fila de atrás), Nuria Salazar, María Fernández, Clara G. de los Reyes-Gavilán, Abelardo Margolles, Lorena Valdés, Irene Ordoñez (fila delantera) e Irene Rodríguez (en recuadro).

liales que mantienen la estructura y realizan funciones de adsorción y defensa, se localiza el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) en el que se encuentran el mayor número de células inmunes de nuestro cuerpo. La mucosa intestinal es por tanto el primer punto en el que los probióticos interactúan con el sistema inmune. Estamos pues interesados en conocer la respuesta que los probióticos inducen en el hospedador y cómo éste modifica las propiedades de las bacterias. Por ello recientemente hemos puesto en marcha un laboratorio de trabajo con células eucariotas humanas, fundamentalmente líneas celulares inmortales y cultivos primarios de células inmunes sanas aisladas de sangre o de intestino, y hemos implementado técnicas que nos permiten estudiar la respuesta inducida por los probióticos o sus componentes (proteínas de superficie, EPS, metabolitos, etc.). De este modo, pretendemos avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de los probióticos y, además, podemos caracterizar y seleccionar cepas probióticas en función del tipo de respuesta que inducen con el objetivo de ser aplicadas en las poblaciones diana adecuadas.

### DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA FUNCIONALIDAD DE PROBIÓTICOS

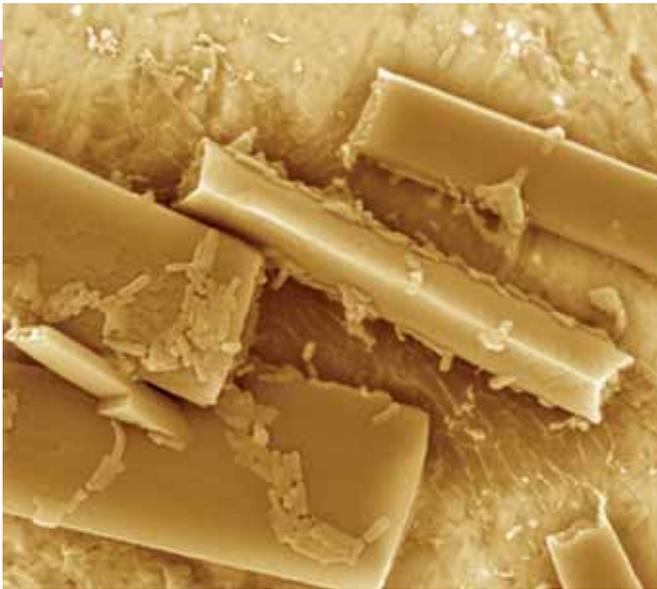
Para que un probiótico pueda ser empleado en la industria alimentaria debe ser capaz de sobrevivir a los diversos estreses tecnológicos a los que son sometidas las cepas, desde su preparación como “starter” funcional para ser añadido en la formulación del alimento, hasta el procesado y almacenamiento del producto final. En este sentido, el oxígeno, temperatura y actividad de agua son los principales retos a los que las cepas probióticas, generalmente muy sensibles, deben responder. Por ello consideramos que es especialmente interesante, desde un punto de vista aplicado, la caracterización de la aptitud tecnológica de las nuevas cepas con potencial probiótico, así como la obtención de cepas adaptadas a estos factores de estrés. También estamos interesados, como estrategia futura, en la implementación de nuevas tecnologías para incrementar la supervivencia y viabilidad de aquellas cepas que hayan mostrado un potencial probiótico elevado, científicamente demostrado.

Para llevar a cabo este trabajo, aplicamos diversas metodologías que van desde la microbiología clásica y molecular, a las técnicas “ómicas” más recientes, así como diversas técnicas de química analítica, tecnología de alimentos y más recientemente, protocolos de biología celular. Dado el carácter multidisciplinar de nuestra investigación actual, colaboramos activamente con científicos nacionales e internacionales de otras áreas de conocimiento, como inmunología, fisiología animal,

química y medicina. Sin embargo, ninguno de nuestros logros pasados, presentes y, esperemos futuros, se habría conseguido sin el capital humano que ha formado y forma parte de nuestro grupo de investigación. A todos ellos, colaboradores y miembros del grupo, queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento.

### SELECCIÓN DE 20 PUBLICACIONES EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

- Gueimonde *et al.* (2007). Competitive exclusion of enteropathogens form human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile - A preliminary study. *Int J Food Microbiol.* 113:228-232.
- Ruas-Madiedo *et al.* (2007). Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 73:4385-4388.
- Ruiz *et al.* (2007). Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol Lett.* 274:316-322.
- Sánchez *et al.* (2007). Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Appl Environ Microbiol.* 73:6450-6459.
- Ruas-Madiedo *et al.* (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 74:1936-1940.
- Salazar *et al.* (2008). Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 74:4737-4745.
- Sánchez *et al.* (2008). Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*. *Frontiers Biosci.* 13:6905-6919.
- Ruas-Madiedo *et al.* (2009). Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1204-1207.
- Salazar *et al.* (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *J Dairy Sci.* 92:4158-4168.
- Turroni *et al.* (2009). Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *ISME J.* 3:745-751.
- Gueimonde *et al.* (2010). Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 76: 3664-3669.
- Ruas-Madiedo *et al.* (2010). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J Appl Microbiol.* 109:2079-2086.
- Sánchez *et al.* (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *Int Dairy J.* 20:800-805.
- Solis *et al.* (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe.* 16:307-310.



**Foto 2.** *Bifidobacterium longum* sobre cristales de bilis (A, barra 20 mm) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B, barra 5 mm) visualizados mediante cryo-SEM.



**Foto 3.** Dr. Probiota, ¿quién estudia a quién? (María Fernández y Toni Colom).

Turróni *et al.* (2010). Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc Nat Acad Sci USA*. 107:19514-19519.

Arboleña *et al.* (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol*. 149:28-36.

De los Reyes-Gavilán *et al.* (2011). Adhesion of bile-adapted *Bifidobacterium* strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol*. 162:514-519.

López *et al.* (2011). Immune response to *Bifidobacterium bifidum* strains support Treg/Th17 plasticity. *PLoS One* 6(9):e24776.

Ruiz *et al.* (2011). Evaluation of the ability of *Bifidobacterium longum* to metabolize human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*. 314: 125-130.

Salazar *et al.* (2011). Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA-R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA-E44 orally administered to Wistar rats. *Int J Food Microbiol*. 144:342-351.

## Evaluación y control de microorganismos toxigénicos en productos cárnicos madurados

Miguel Ángel Asensio

Higiene y Seguridad Alimentaria. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Apto 643. 10003-Cáceres

Los productos cárnicos de larga maduración se mantienen en refrigeración hasta que se logra una reducción de la humedad que impide el desarrollo de la microbiota alterante y de las bacterias toxigénicas. A medida que disminuye la humedad del producto va limitándose el desarrollo de las bacterias, mientras que la población fúngica puede desarrollarse a lo largo de todo el procesado durante meses. Los primeros estudios del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria demostraron la presencia de mohos productores de toxinas en el jamón. Paralelamente se estudió la posible contribución de los microorganismos a la maduración del jamón, concluyéndose que tanto las microcócicas como las levaduras y los mohos poseen una alta actividad proteolítica sobre proteínas miofibrilares y se demostró la

contribución de *P. chrysogenum* y *Debaryomyces hansenii* tanto a la proteólisis como a la formación de compuestos volátiles en lomos y jamones madurados (Martín y col., 2006; Benito y col., 2005; Andrade y col., 2009a).

Uno de los principales problemas que plantea el control de los microorganismos toxigénicos en el jamón curado radica en la presencia de una gran diversidad de especies que incluyen cepas productoras y no productoras de toxinas, junto a la dificultad de demostrar la producción de las toxinas dado el papel decisivo que desempeñan las condiciones ambientales en la producción de estos metabolitos secundarios. La actividad reciente del grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria se ha centrado en controlar el desarrollo de microorganismos inde-